

09/037510

PCT/JP 00/02011

JP00/02011

30.03.00

4
日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 MAY 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年 3月30日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第090256号

出願人
Applicant(s):

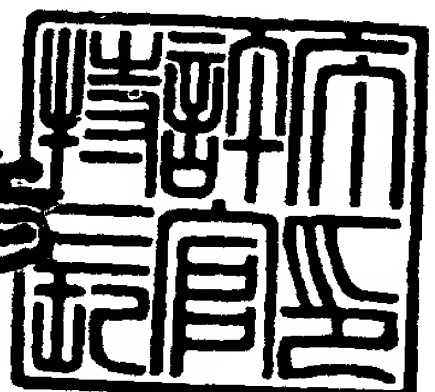
株式会社ネーテック
川澄化学工業株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 5月12日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3032544

【書類名】 特許願

【整理番号】 J77185A1

【提出日】 平成11年 3月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12M 1/16

【発明の名称】 レクチンを用いた血液細胞の選択的分離方法

【請求項の数】 5

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区久本 3 丁目 1 2 番 2 0 ルネサンス
 スフォルム溝の口 7 0 2 号

 【氏名】 由良 洋文

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区長浜 2 丁目 6 番地 1 9 号

 【氏名】 斎藤 芳夫

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都大田区田園調布 4 - 4 5 - 1 6 - 2 0 3

 【氏名】 北川 道弘

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区南大井 3 丁目 2 8 番 1 5 号 川澄化学工業
 株式会社内

 【氏名】 若松 大介

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都品川区南大井 3 丁目 2 8 番 1 5 号 川澄化学工業
 株式会社内

 【氏名】 井原 晃

【特許出願人】

 【識別番号】 596021735

 【氏名又は名称】 株式会社ネーテック

【特許出願人】

【識別番号】 000200035

【氏名又は名称】 川澄化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100064908

【弁理士】

【氏名又は名称】 志賀 正武

【選任した代理人】

【識別番号】 100089037

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡邊 隆

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008707

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607314

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レクチンを用いた血液細胞の選択的分離方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 分化した成熟細胞及び未成熟な造血性細胞並びに赤芽球を含む血液試料から造血細胞及び／または赤芽球を選択的に分離回収する方法において、当該方法が、

(1) 前記試料を、細胞を不活性化する条件下においてレクチンと作用させて細胞－レクチン複合体／非複合体を形成する工程、

(2) 前記細胞－レクチン複合体／非複合体を含む試料を、前記条件下で、前記レクチンに特異的に認識される糖鎖を有する糖鎖高分子で表面被覆した基材とともにインキュベーションして前記細胞をレクチンを介して前記基材表面に固定化する工程、及び、

(3) 液相と固相とを分離し、液相及び／または固相から目的とする造血細胞を回収する工程を含んでなり、

前記レクチンが、前記固相から回収される細胞とは結合して基材表面に固定化するが、前記液相から回収される細胞は基材表面に固定化しない量で存在することを特徴とする血液細胞の選択的分離方法。

【請求項 2】 前記細胞を不活性化する条件が、

(a) 0℃以上 37℃未満の低温条件、または、

(b) 細胞呼吸を停止させる試薬を添加する条件であることを特徴とする請求項 1 記載の血液細胞の選択的分離方法。

【請求項 3】 前記レクチンの濃度が、少なくとも細胞 1 個当たり 20 mg / ml 以下の範囲であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の血液細胞の選択的分離方法。

【請求項 4】 前記工程 (1) のインキュベーション時間を 0 から 120 分間とし、前記工程 (2) のインキュベーション時間を 10 から 120 分間としたことを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の血液細胞の選択的分離方法。

【請求項 5】 基材が、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリスルホン、

ポリウレタン、ビニル系共重合体、またはガラス製のシャーレ、フラスコ、プレート、キュベット、フィルム、ファイバー、ビーズから選択された基材であり、前記レクチンと結合できる糖成分を結合させたことを特徴とする請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の分離方法を行うための血液細胞の選択的分離装置。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レクチンを用いた造血細胞の分離方法、特に、末梢血、骨髓液、臍帯血等に含まれる成熟細胞や未成熟細胞の両方をランダムに含有する試料から目的とする血液細胞をレクチンを介して選択的に分離回収する方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

造血幹細胞は多分化能と自己複製能とを併せ持った細胞である。一生に渡り枯渇することなく血球が産生されるためには造血幹細胞のもつ自己複製能は最も重要な性質と考えられる。造血幹細胞の多分化能に関しては、例えば、図 1 に示すように、幹細胞は、骨髓性幹細胞とリンパ性幹細胞とに分化し、それらはさらに分化して、骨髓細胞からは血小板、（成熟）赤血球、顆粒球及び単球等、リンパ性幹細胞からは T 細胞や B 細胞等の血液細胞が生成される。

【0 0 0 3】

血液細胞には寿命があり種々の生理的要求に従って消費されるので、幹細胞からの分化によって適宜補充される必要がある。ところが、例えば急性骨髓性白血病患者等では、分化した機能的な血液細胞そのものや幹細胞分化に異常が生じ、機能的な赤血球、白血球、血小板などの補充が困難になっている。このような血液性疾患の治療方法として、造血幹細胞の移植は、化学治療のような副作用がなく、造血細胞の分化及び再生を正常化することが可能となる。しかし、この大きな利点にも関わらず、幹細胞は殆どが骨髓に分布しているため、その採取には困難が伴う。胎盤血及び臍帯血には比較的多くの幹細胞が含まれて低侵襲的採取が可能であり、また、提供者の侵襲が最も少ない末梢血では、そこに存在する幹細胞は有核細胞の $1 / 10^5$ 程度の割合といわれている。

【 0 0 0 4 】

さらに、幹細胞移植においては、提供者とのHLA型が一致しない場合、対宿主性移植片病（GVHD）と呼ばれる免疫拒絶反応を誘発することがある。従って、有効で安全な幹細胞移植をするためには、血液試料を選択的に分離精製し、GVHDの原因となるリンパ球成分を除去して純粋な幹細胞を得ることが重要である。

また、純粋な幹細胞が単離できれば、それをサイトカインで刺激して増幅させたり、次なる使用のために保存しておく幹細胞バンキングの発展にも寄与することとなる。

【 0 0 0 5 】

一方、近年の遺伝子操作技術の発達に伴い、有核胎児細胞を対象に出生前遺伝子診断の試みが行われている。この出生前遺伝子診断に用いられ始めている胎児有核細胞の採取方法で現在臨床応用されているものは、羊水穿刺、絨毛採取、胎児採血といった侵襲的な手法であり、破水と感染のリスクが伴う。母児にとって非侵襲的な採血方法としては、母体末梢血を用いることであり、胎児細胞が母体血に混入することも従来から知られてはいたが、母体末梢血に含まれる胎児有核赤芽球（NRBC）は、例えば末梢血中の全有核細胞の $10^5 \sim 10^7$ 個に1個という極めて少量しか存在しないため、その細胞をいかに濃縮、分離、同定するかが胎児細胞の遺伝子診断の成否の鍵を握っている。

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、従来から糖鎖が有する特異的相互作用に着目し研究を行ってきており、種々の糖鎖を側鎖に有する糖鎖高分子をシャーレ等の基材表面に被覆することにより、その糖鎖に親和性を有するレクチンを選択的に固定化する方法について特許出願している（特願平 8 - 5 9 6 9 5）。

一方、図 1 にも示したように、造血幹細胞は、成熟するに従って細胞表面に種々の糖鎖を表現するようになる。なお、図 1 における符号「Gal」はガラクトース、「Glu」はグルコース、また、「Lac」はラクトース（Glu-Gal）を表す。前記特許の明細書には、ガラクトース認識性のレクチン（All -A）を固定化した基材表面にガラクトースを表現するヒト成熟赤血球が選択的に接着することが記

載されている。

【0 0 0 7】

今回、本発明者らは、レクチンを介した糖鎖高分子への造血細胞の固定化についてさらに詳細に検討し、インキュベーション温度及び用いるレクチンの添加量により、細胞及び／または糖鎖高分子とレクチンとの間に特有な相関関係が生ずることを見だし、本発明をなすに至った。

【0 0 0 8】

【発明が解決しようとする課題】

よって、本発明における課題は、レクチンを用いて目的とする幼若な血液細胞やNRBCを選択的かつ高収率で分離、濃縮及び回収する方法、並びにその方法を利用した分離装置を提供することである。

【0 0 0 9】

【課題を解決するための手段】

かかる課題は、分化した成熟細胞及び未成熟な造血性細胞並びに赤芽球を含有する血液試料から造血細胞及び／または赤芽球を選択的に分離回収する方法において、当該方法が、

(1) 前記試料を、細胞膜を不活性化する条件下において、レクチンと作用させて細胞－レクチン複合体／非複合体を形成する工程、

(2) 前記細胞－レクチン複合体／非複合体を含む試料を、前記条件下で、前記レクチンに特異的に認識される糖鎖を有する糖鎖高分子で表面被覆した基材とともにインキュベーションして前記細胞をレクチンを介して前記基材表面に固定化する工程、及び、

(3) 液層と固相とを分離し、液相及び／または固相から目的とする血液細胞を回収する工程を含んでなり、

前記レクチンが、前記固相から回収される細胞と結合し前記固相とは結合するが、前記液相から回収される細胞が前記固相とは結合しない量で存在することを特徴とする造血細胞の分離方法によって解決される。

【0 0 1 0】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の分離方法では、第 1 段階として、固相に固定化すべき細胞を含有する試料を、その細胞が表現している糖鎖を認識するレクチンと作用させて細胞-レクチン複合体/非複合体を形成する。ここで、細胞-レクチン複合体/非複合体とは、細胞とレクチンとが結合した複合体と、結合していないフリーな細胞及びレクチン（非複合体）の両方が共存している状態を意味する。この過程は、前記細胞を不活性化する条件下において行われる。

【0011】

ここで、細胞を不活性化する条件とは、細胞膜の流動性及び自発的粘着力を低下させる条件を意味し、典型的には、温度を 0℃以上～37℃未満、好ましくは 0～36℃、より好ましくは 4～30℃、さらに好ましくは 4～22℃に調節することによって達成される。しかし、この条件は、前記低温調節に限られるものではなく、例えば、37℃においてアジ化ナトリウム等の細胞呼吸を停止させる試薬を添加することによっても達成できる。

【0012】

レクチンは、固定化すべき細胞が表現している糖鎖を認識するものを用いる。例えば、図 1 に示したように、ガラクトースやグルコースを表現している末梢の成熟した白血球、血小板や赤血球などを固定化する場合には、SBA、PNA、ECL、Allo A、VAA等のガラクトース認識性のレクチンや、GNL、LcH、PSA等のグルコース認識性レクチン、マンノースを表現する細胞を固定化する場合には、LCA、GNA、CPA等のマンノース認識性レクチンを選択する。

【0013】

レクチンの添加量は固定化すべき細胞の種類等によって変化し、基本的には、後述する第 2 段階のインキュベーションにおいて、糖鎖高分子被覆した基材表面に、固定化すべき細胞（後に固相から回収される細胞）は結合するが、固定化すべきでない細胞（後に液相から回収される細胞）は前記基材表面に結合しない量とする。

このレクチン添加量を特定することにより、例えば白血球などの細胞の成熟性

に対する選択性や、白血球、赤血球等の細胞型間の選択性を制御することが可能になる。具体的には、少なくとも細胞1個以上に対して 20 mg/ml 以下の濃度で調整する。この添加量はレクチンの性質等によっても変化し、例えば、レクチンとしてSBAを用いたときは、 5 mg/ml で十分である。

【0014】

特に、糖鎖高分子として β 結合ガラクトースを有するラクトース末端または α 結合ガラクトース末端を有するメリビオースを組み込んだポリマーを用いた場合、CD34陽性の幼若な細胞（幹細胞）のみを選択的に固定化せず、CD34陰性の成熟した細胞を固定化すべきときには、細胞 2×10^6 個を含む試料に対するレクチンの添加濃度を $0.001 \sim 0.9\text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.002 \sim 0.10\text{ mg/ml}$ 、さらに好ましくは $0.025 \sim 0.05\text{ mg/ml}$ とする。また、赤血球（NRBC）を選択的に固定化し、白血球などの他の細胞を固定化しない場合には、細胞 2×10^6 個を含む試料に対するレクチンの濃度を、 $0.001 \sim 0.30\text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.050 \sim 0.01\text{ mg/ml}$ 、さらに好ましくは $0.010 \sim 0.050\text{ mg/ml}$ とする。

【0015】

この第1段階におけるインキュベーション時間は特に限定されず、少なくとも細胞とレクチンとが後述の第2段階の前に作用され、細胞-レクチン複合体/非複合体を形成すればよく、典型的には $0 \sim 120$ 分間、好ましくは $0 \sim 90$ 分間、さらに好ましくは $0 \sim 60$ 分間とする。ただし、「0分」とは、第1段階を行った直後に第2段階に移行することを意味する。その結果、固定化されるべき細胞とレクチンとが、細胞-レクチン複合体/非複合体を形成する。

【0016】

次に、本発明の分離方法の第2段階として、前記細胞-レクチン複合体を含む試料を、前記細胞を不活性化する条件下で、前記レクチンに特異的に認識される糖鎖を有する糖鎖高分子で表面被覆した基材内でインキュベーションする。

【0017】

ここで用いる基材は、シャーレ、フラスコ、プレート、キュベット、フィルム、ファイバー、またはビーズ等の従来から細胞培養に用いられている基材から選

択できるが、用途に応じていかなる形状の基材も使用できる。

これらの基材は、ガラス、石英等の無機材料、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリウレタン、ビニル系共重合体等の有機材料のいずれからなっているもよいが、滅菌可能な程度の耐熱性及び耐水性を有している材料からなるのが好ましい。特に合成高分子材料は、価格や成形性の点から好ましく、糖鎖高分子の吸着性から疎水性のものが好ましい。例えば、ポリスチレンやその誘導体を主鎖とする糖鎖高分子を用いる場合には、ポリスチレン及びその誘導体を主原料とする基材を使用するのが好ましい。

【 0 0 1 8 】

前記の基材表面には、第 1 段階で用いたレクチンに特異的に認識される糖鎖を有する糖鎖高分子を被覆する。

糖鎖高分子の例として、以下のものを挙げることができる。

- ・ p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られ β -ガラクトース残基を有する、ポリ (N-p-ビニルベンジル- [O- β -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 4)-D-グルコンアミド]) (PVL A と略記する) ;

- ・ p-アミノメチルスチレンとマルトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られグルコース残基を有するポリ (N-p-ビニルベンジル- [O- α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-D-グルコンアミド]) (PVM A と略記する)

- ； ・ p-アミノメチルスチレンとマンノビオースとから合成されたモノマーを単独重合して得られマンノース残基を有するポリ (N-p-ビニルベンジル- [O- β -D-マンノピラノシル-(1 \rightarrow 4)-D-マンナミド]) (PVM a n と略記する) ;

- ・ p-アミノメチルスチレンと O- α -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 6)-D-グルコースとから合成されたモノマーを単独重合して得られ α -ガラクトース残基を有するポリ (N-p-ビニルベンジル- [O- α -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 6)-D-グルコンアミド]) (PVM e A と略記する) ;

- ・ p-アミノメチルスチレンとラクトースとから合成されたモノマーを単独重合して得られる PV-L A をカルボキシメチル化して得られカルボキシメチル

化- β -ガラクトース残基を有するポリ (N-p-ビニルベンジル- [O-6-カルボキシメチル- β -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 4) -O-D-6-カルボキシメチル-グルコンアミド]) (PVLACOOHと略記する) ;

・ p-クロロメチルスチレンとグルコースとから合成されたモノマーを単独重合して得られグルコース残基を有するポリ (3-O-4' -ビニルベンジル-D-グルコース) (PVGと略記する) ;

・ N-アセチルグルコサミン残基を有するポリ (N-p-ビニルベンジル- [O-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 4) -O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 4) -O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド])、ポリ (N-p-ビニルベンジル- [O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 4) -O-D-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド])、及びこれらの混合物 (いずれもPVG1cNacと略記する) ; 及び、

・ p-アミノメチルスチレンとラミナリビオースとから合成されたモノマーを単独重合して得られ β 1 \rightarrow 3 グルコース残基を有するポリ (N-p-ビニルベンジル- [O- β -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) -D-グルコンアミド]) (PVLamと略記する)。

【0019】

これらの糖鎖高分子は、上記のようなホモポリマーでもよく、他のモノマーとのコポリマーでもよい。例えば、光反応性官能基であるアジド基を有するモノマーとのコポリマーは、光照射によって容易に基材表面と共有結合できるので好ましい。アジド基を導入した糖鎖高分子として、前記PVL Aとのコポリマーであるポリ (3-アジドスチレン-co- {N-p-ビニルベンジル- [O- β -D-ガラクトピラノシル- (1 \rightarrow 4) -D-グルコンアミド] }) (AZ-PVL Aと略記) ; 前記PVMAとのコポリマーであるポリ (3-アジドスチレン-co- {N-p-ビニルベンジル- [O- α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 4) -D-グルコンアミド] }) (Az o-PVMAと略記) 等を挙げることができる。

【0020】

この第2段階のインキュベーションを細胞培養用のディッシュやフラスコ等を

用いた場合は、第 1 段階と同様の条件下で、典型的には 1 0 ～ 1 2 0 分間、好ましくは 2 0 ～ 9 0 分間、さらに好ましくは 3 0 ～ 7 0 分間行われる。その結果、固定化すべき細胞－レクチン複合体が基材表面の糖鎖高分子を介して基材に固定化される。また、ビーズや不織布を充填したカラムで細胞の沈降時間を無視できる条件では、さらに時間を短縮することができる。

【 0 0 2 1 】

次いで、本発明の分離方法の第 3 段階として、基材に固定化された固相と、固定化されずに残った液相とを分離する。例えば、糖鎖を被覆したビーズやプレートで充填したカラムを用いた場合には、第 1 段階で得られた細胞－レクチン複合体／非複合体を含む試料をカラムに通すだけで、液相をカラムの注出口から回収することによって固相と分離できる。

【 0 0 2 2 】

最後に、液相及び／または固相から目的とする造血細胞を回収する。例えば糖鎖高分子として P V L A を用い、ガラクトース特異的レクチンとして S B A 等を用いた場合、その固定化され易さは、成熟赤血球、N R B C > 白血球 > 幹細胞という順序になる。従って、レクチンの量を低下させると、まず幹細胞が固定化されなくなり、次いで白血球が固定化されなくなり、最終的には成熟赤血球、N R B C のみが選択的に固定化されることになる。逆に言えば、幹細胞のみが固定化されなくなるレクチン添加量で本発明の分離方法を実施すれば、液相には幹細胞のみが選択的に含まれており、そこから幹細胞を高純度で回収することができる。また、レクチン添加量をさらに低下させ、成熟赤血球及び N R B C のみを固定化すれば、固相から成熟赤血球、N R B C を選択的に回収することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明の分離方法にあっては、前記第 1 段階に先立って、採取した血液試料から、顆粒球及び白血球等を予め除去し、目的とする細胞を濃縮しておくこともできる。

また、図 1 に示されるように、グルコース系の糖鎖高分子とレクチンとの組み合わせも同様に実施できることは言うまでもない。

【 0 0 2 4 】

一般に、細胞を分離する方法として、目的とする細胞以外の細胞を固定化して除去するネガティブ・セパレーションと、目的とする細胞を固定化して濃縮するポジティブ・セパレーションとが知られているが、本発明の分離方法は、レクチンの濃度を適宜調整することによって、ネガティブ及びポジティブ・セパレーションの両方の手法を利用することができる。

【 0 0 2 5 】

なお、造血幹細胞といった微量に含まれる細胞を、廃棄される細胞数を極力少なくしながら選択的に分離するには、上記の方法を複数回繰り返して、目的とする細胞の回収率をさらに向上させることもできる。

【 0 0 2 6 】

本願発明に係る分離方法によって分離精製される血液試料は、末梢血を含む如何なるものであってもよいが、幹細胞を選択的に回収するには、骨髓液、臍帯血または胎盤血とするのが好ましい。また、N R B Cを選択的に回収するには、臍帯血、母体血とするのが好ましい。

【 0 0 2 7 】

【実施例】

以下に、本発明の分離方法について、糖鎖高分子としてA Z - P V L A、細胞浮遊液として0. 1重量%ウシ血清アルブミンを添加した生理的リン酸緩衝液（P B S）を用い、未成熟細胞である造血幹細胞を選択的に分離回収する場合を例として具体的に説明する。

【 0 0 2 8 】

1 : インキュベーション条件

実施例 1 : 温度効果 (1)

第 1 段階 : フィコール法で回収された臍帯血由来の血球から塩化アンモニウム溶液で赤血球を溶血し、単核球を含む白血球分画を得た。P P チューブ中で、 2×10^6 個 / ml の臍帯血由来の単核球懸濁液に対し、種々の濃度の S B A（ガラクトース認識性のレクチン）を含む P B S を添加し、4℃で30分間、5分毎に攪拌しながらインキュベーションした。

第 2 段階 : 上記インキュベーション終了後、懸濁液を A Z - P V L A 被覆した

直径35mmディッシュに移し、さらに上記等張塩溶液1mlでチューブをリンスし、そのリンス液も同じディッシュに加えて、4℃から37℃の複数の温度で60分間インキュベーションした。

第3段階：揺動後、懸濁液を回収し、上記PBS1mlで洗浄して、固相（シャーレ）と液相（懸濁液）とを分離した。

【0029】

得られた細胞懸濁液中の回収細胞数を自動血球計数器で測定し、仕込み細胞数に対する接着細胞数の割合（接着率）を計算した。その結果、いずれの温度においてもレクチン添加量を増加させるにつれて接着率が増大する傾向が見られた。そこで、単核球80%接着させるために最低限必要なレクチン（SBA）の添加量を各温度について以下の表1にまとめた。

【0030】

【表1】

処理温度	臍帯血由来の単核球を80%接着させるために必要な最低SBA添加量（細胞 2×10^6 個当たり）
37℃	1.0mg
30℃	0.5mg以下
10℃	0.050mg
4℃	0.025mg

【0031】

これらの結果から、単核球を80%接着させるために必要なレクチン（SBA）添加量は、温度が低下するに従って減少すること、即ち、インキュベーション温度を低温にすることにより、少量のレクチンで接着分離可能となるように接着効

率が向上することがわかった。4℃では、0.01mgで50%程度の細胞接着が観察された。

なお、これらの細胞接着が、レクチンを介した糖鎖特異的なものであることは、前記ディッシュに種々の濃度のガラクトース液を添加することにより、4℃の場合も37℃の場合も、細胞接着が60～90%程度まで阻害されたことから確認された。

【0032】

実施例2：温度効果（2）

用いるレクチンをPNA及びECL（ともにガラクトース認識性）に換えた以外は、実施例1と同様の条件で実験を行い、以下の表2に示す結果を得た。

【0033】

【表2】

レクチン	添加量 mg / 細胞 2×10^4 個	接着率	
		処理温度 4℃	処理温度 37℃
PNA	0.72	73	44
ECL	0.02	81	58

【0034】

表2の結果から、用いるレクチンの種類に関わらず、細胞接着率とインキュベーション温度とに相関関係が存在することが明らかになった。

【0035】

実施例3：温度効果の実体

実施例1における37℃でのインキュベーションの場合と同じ条件で、細胞浮遊液にアジ化ナトリウムを添加して同様の実験を行った。結果を表3に示す。た

だし、細胞接着性は、固定化されずに回収された非接着細胞の割合（回収率）で表した。

【0036】

【表3】

処理条件（SBA添加量：1mg／細胞 2×10^5 個）	回収率（％）
インキュベーション温度 37℃	14.8
インキュベーション温度 37℃ + 10mMアジ化ナトリウム	3.9
インキュベーション温度 4℃	6.7

【0037】

これらの結果から、レクチンを介した細胞接着性は、温度低下とともに向上するが、この現象は温度を下げずとも、細胞の代謝活性を抑制することが知られているアジ化ナトリウムを添加した場合についても見られることを示している。即ち、レクチンの細胞に対する温度依存的な親和性は、細胞の膜運動性の影響を受け、膜運動性が低下することにより親和性が向上する傾向があることが示唆された。

【0038】

2. 選択的親和性

実施例4：白血球の成熟性に基づく選択的親和性

白血球細胞は幼若な細胞は表面にCD34と呼ばれる表面マーカーを表現し（CD34陽性）、成熟するとCD34陰性となることが知られている。従来は、CD34抗体を用いて幼弱な細胞を選択的に固定化することも行われている。ここでは、糖鎖高分子として β -結合型ガラクトース末端を有するPVLA（インキュベーション温度4℃、37℃）及び α -結合型ガラクトース末端を有するPVMaA（インキュベーション温度4℃）を用い、種々のレクチン添加量での選

択的接着性を検討した。結果を表 4 に示す。表中のレクチン (S B A) 添加量は、細胞 2×10^6 個に対する量である。

【0 0 3 9】

【表 4】

白血球の成熟性	細胞接着率 (%)		
	SBA 0.025mg PVMeA(4℃)	SBA 0.05mg PVLA(4℃)	SBA 1mg PVLA(37℃)
C D 3 4 陽性幼若細胞	2 0	1 5	1 2
C D 3 4 陰性成熟細胞	7 6	7 3	7 0

【0 0 4 0】

これらの結果から、レクチンを介した本発明の分離方法によれば、C D 3 4 陽性の幼若細胞と C D 3 4 陰性の成熟細胞とを選択的に分離することができることが解った。しかも、インキュベーション温度を低温に設定することにより、必要とされるレクチン添加量が $1/20$ 程度に低減される。また、糖鎖高分子として P V M e A を用いた場合は、P V L A を用いた場合に比較して、レクチン添加量をさらに減少させても選択的接着性が得られることが示された。本発明者らは、このような細胞成熟性に基づくレクチンとの相互作用の選択性を、細胞表面に発現しているガラクトースの密度の違いによるものと考えている。

【0 0 4 1】

実施例 5：血球間の選択的親和性

インキュベーション温度を 4℃ とし、実施例 1 と同様の実験を行なって、臍帯血由来の赤血球及び白血球の 95% を接着するのに必要なレクチン添加量を求めた。この場合、溶血操作は行わなかった。結果を下記の表 5 に示す。

【0 0 4 2】

【表 5】

細胞	赤血球又は白血球が 9 5 % 以上接着されるのに必要な 必要なレクチン添加量 (細胞 2×10^6 個)
白血球	3 0 0 μ g 以上
赤血球	5 0 μ g 以上

【0 0 4 3】

表 5 に示すとおり、赤血球と白血球とのレクチンを介した接着性を比較すると、赤血球の方が親和性が高く、より低いレクチン添加量で接着可能であることがわかる。

【0 0 4 4】

実施例 6：臍帯血赤芽球の分離

インキュベーション温度を 4℃とし、レクチン (SBA) 添加量を、細胞 2×10^6 当たり 5 0 μ g 以下という少量で変化させて、PVL A 被覆したディッシュに接着された細胞を検査した。検査方法は、接着細胞をディッシュ上で乾燥させ、ハマトキシリン、エリスロシンで細胞を染色し、正染色性赤芽球をカウントすることによって行い、ランダムに選択した領域で 1 0 0 個の細胞をカウントしたとき、その中に含まれる赤芽球の数で評価した。結果を図 2 に示す。図中、PRE は、多量 (300 μ g) のレクチンを添加して殆ど全ての細胞を接着するようにした比較例である。

【0 0 4 5】

添加するレクチンの量を減少させ、レクチンに対する親和性が低い白血球の付着を阻害すると、ディッシュ上に成熟赤血球と赤芽球を選択的に接着させることができる。従って、臍帯血中に少量しか存在しない赤芽球を 1 個以上 / 1 0 0 個という高い確率で検出することができた。

【0 0 4 6】

実施例 7 : 母体血の胎児赤芽球の濃縮

実施例 6 の方法に準じて、母体血からフィコール分離された細胞分画を回収し、細胞 2×10^6 個に対して 0.01 mg のレクチン (SBA) を添加して、直径 35 mm の PVLA 被覆ディッシュ中、 4°C で 60 分間インキュベーションした。比較のため、レクチン添加量を 0.3 mg とした場合も調べた。20 例について試験した結果を下記表 6 に示す。

【0047】

【表 6】

ディッシュ上に接着した 正染色赤芽球数	レクチン添加量	
	0.01 mg	0.3 mg
0 ~ 1 個	1 例	19 例*
2 ~ 5 個	3 例	1 例*
6 ~ 10 個	7 例	—
11 ~ 30 個	8 例	—
31 個以上	1 例	—

* 0.3 mg 添加した場合、赤芽球以外の有核白血球の接着が多すぎてカウントできなかったものを含む。

【0048】

これらの結果から、レクチン添加量を減少させて白血球の接着を阻害すると、赤芽球を選択的に濃縮することができ、母体血から遺伝子診断に有用な赤芽球を

効率よく検出できることが示された。また、このような結果は、糖鎖高分子として P V M e A を用いた場合でも再現された。

【 0 0 4 9 】

以上、詳細に説明したように、本発明の分離方法及び分離装置は、細胞－レクチン及び糖鎖－レクチンの相互作用に基づくものである。より詳細には、これらの相互作用において、細胞の活性状態やレクチン添加量に依存して接着性変化や細胞タイプによる接着選択性が生ずることを利用したものである。本発明の分離方法及び分離装置を用いるより、細胞、特に臨床的に大きな意義を持つ造血幹細胞や N R B C といった細胞を選択的に分離回収することができる。

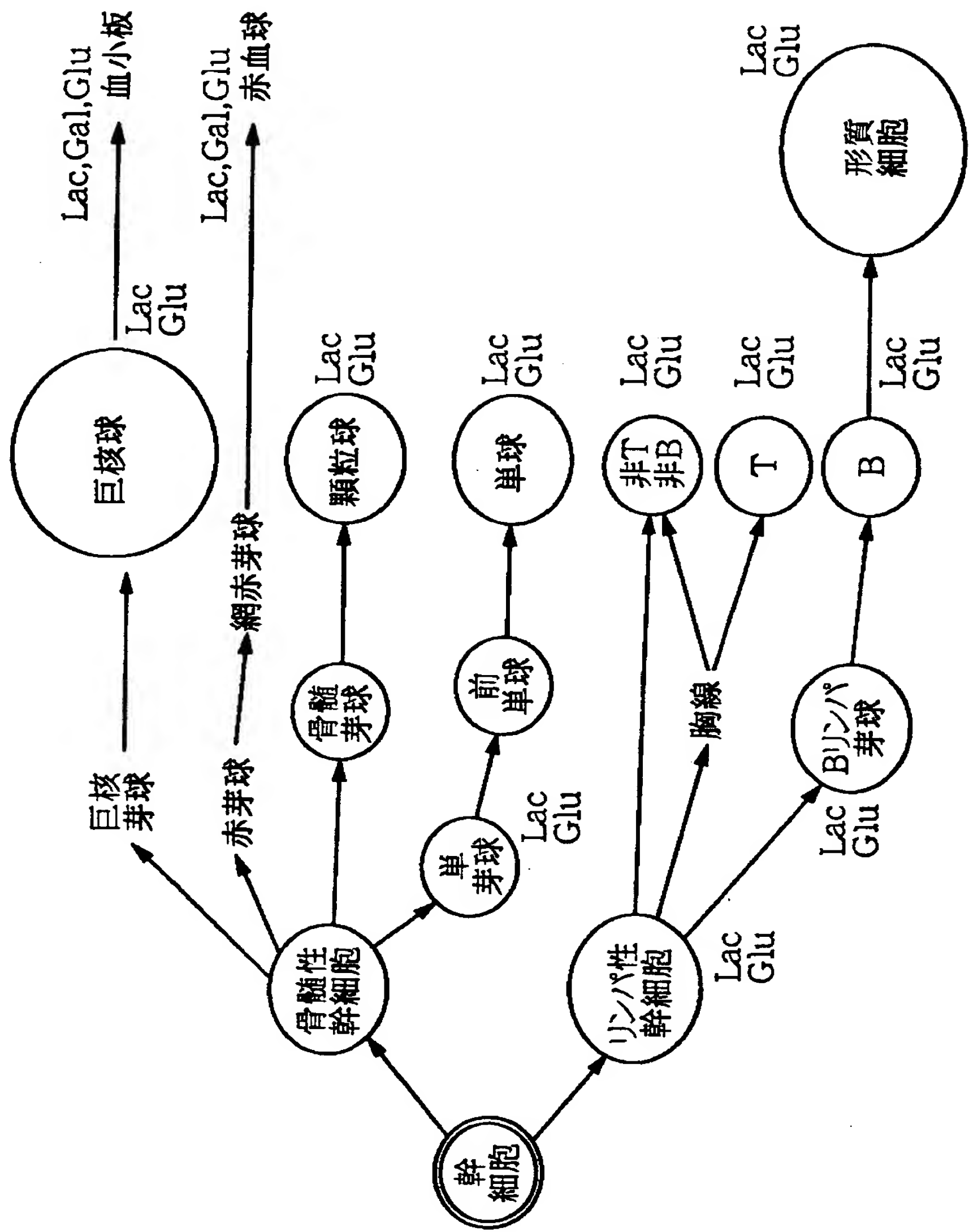
【図面の簡単な説明】

【図 1】 造血幹細胞の分化の様子を示す系統図である。

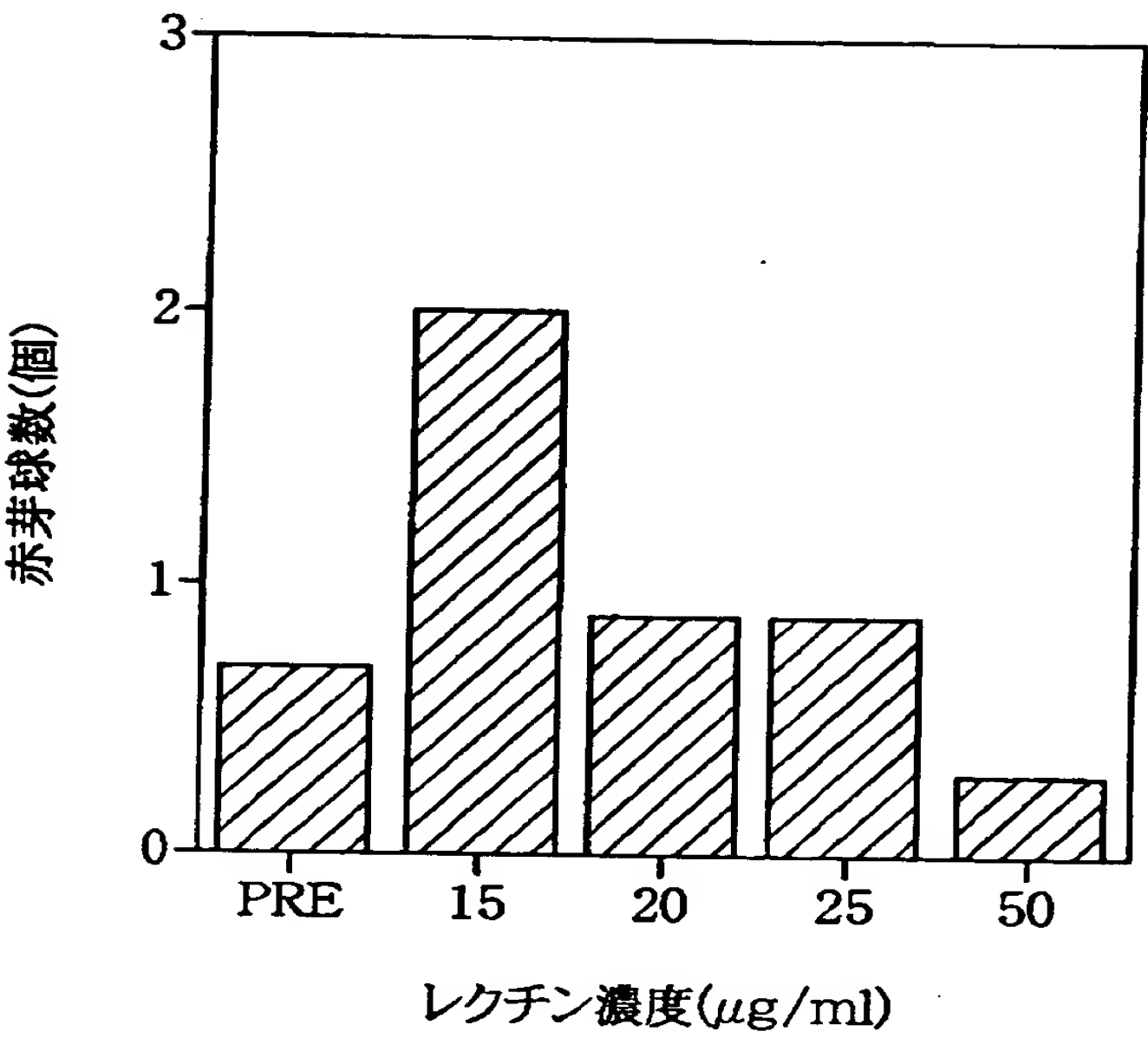
【図 2】 実施例 6 におけるレクチン濃度変化による赤芽球の選択的濃縮の結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 目的とする細胞を選択的かつ高収率で分離、濃縮及び回収する方法を提供する。

【解決手段】 血液試料から目的とする細胞を選択的に分離回収する方法において、前記試料を細胞膜を不活性化する条件下においてレクチンと作用させて細胞－レクチン複合体／非複合体を形成し、前記細胞－レクチン複合体／非複合体を含む試料を前記条件下で前記レクチンに特異的に認識される糖鎖を有する糖鎖高分子で表面被覆した基材とともにインキュベーションして前記細胞をレクチンを介して前記基材表面に固定化し、次いで、液層と固相とを分離し液相及び／または固相から目的とする血液細胞を回収する工程を含んでなり、前記レクチンが前記固相から回収される細胞と結合し前記固相とは結合するが前記液相から回収される細胞が前記固相とは結合しない量で存在する血液細胞の分離方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 6 0 2 1 7 3 5]

1. 変更年月日 1 9 9 6 年 2 月 1 6 日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県川崎市高津区坂戸 3 - 2 - 1 K S P 東 - 3 0 4

氏 名 株式会社ネーテック

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 0 0 0 3 5]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 1 5 日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都品川区南大井 3 丁目 2 8 番 1 5 号

氏 名 川澄化学工業株式会社

